

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE DE L'INDUSTRIE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COPIE OFFICIELLE

RECEIVED

88 SEP -7 AM 8:39

GROUP 180

LE DOCUMENT CI-ANNEXÉ EST LA COPIE CERTIFIÉE CONFORME,
D'UNE DEMANDE DE TITRE DE PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
ENREGISTRÉE A L'INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE.

PUBLIÉ

LE TITRE A ÉTÉ ~~RELEVÉ~~ LE...

23 décembre 1983

ÉTABLIE A PARIS, LE... 23 MARS 1988.....

Pour le Chef de Service
Directeur de l'Institut national
de la propriété industrielle

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Campenon".

Y. CAMPENON

DEMANDE DE
(voir case cochée)

- ☒ BREVET D'INVENTION ☐ CERTIFICAT D'ADDITION
☒ CERTIFICAT D'UTILITÉ ☐ DEMANDE DIVISIONNAIRE
☐ TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN.

DATE DE
REMISE
DES PIÈCES

22 JUN 1982

DATE DE
DÉPÔT

22-06-82

N° D'ENREGISTREMENT
NATIONAL

82 10891

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

DÉPÔT POSTAL 99

DUPLICATA DE LA REQUÊTE

RATTACHEMENT DE LA DEMANDE DIVISIONNAIRE OU DE LA TRANSFORMATION
NATURE, N° ET DATE DE LA DEMANDE INITIALE.

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

CABINET PLASSFRAUD:
84, rue d'Amsterdam,
75009 - PARIS -RÉFÉRENCE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE:

CHP-MTB-100-82-01

DATE DU POUVOIR GÉNÉRAL ET NUMÉRO
DE TÉLÉPHONE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE:

1) TITRE DE L'INVENTION

"Nouveaux trisaccharides à structure D-glucosamine,
acide L-iduronique, D-glucosamine et leur préparation"NOMBRE DE
REVENDICATIONS:

2) DEMANDEUR: NOM ET PRÉNOMS OU DÉNOMINATION ET FORME JURIDIQUE:

N° SIRENE, LE CAS ÉCHÉANT

1

CHOAY s.a.

3) NATIONALITÉ:

française

4) ADRESSE COMPLÈTE:

48, avenue Théophile Gautier,
75782 - PARIS CEDEX 16 -

PAYS

FRANCE

5) INVENTEUR

LE DEMANDEUR EST
L'INVENTEUR

NON

6) LE DEMANDEUR REQUIERT QUE
L'ÉTABLISSEMENT DE L'AVIS
DOCUMENTAIRE SOIT DIFFÉRÉ

OUI

LE DEMANDEUR REQUIERT LE
BÉNÉFICE DU PAIEMENT ÉCHELONNÉ
DE LA TAXE D'AVIS DOCUMENTAIRE

NON

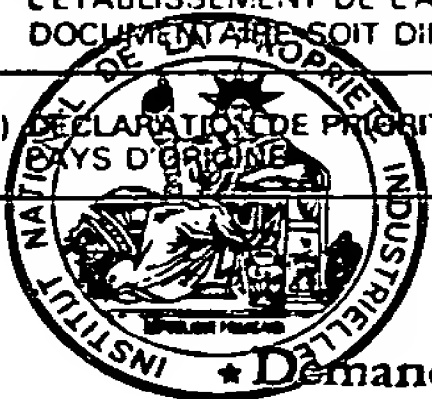
LE DEMANDEUR BÉNÉFICIE
POUR L'INVENTION CONCERNÉE, D'UNE DÉCISION
DE RÉDUCTION DES TAUX DE TAXE

NON

7) DÉCLARATION DE PRIORITÉ

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO



Demande de Certificat d'Utilité résultant de la transformation
de la Demande de Brevet déposée le 22-06-82
(Article 20 de la loi du 2 Janvier 1968 modifiée et articles 42 et 43
du Décret du 19 Septembre 1979)

8) RATTACHEMENT DU CERTIFICAT D'ADDITION:

NATURE DE LA DEMANDE PRINCIPALE:

ADDITIONS ANTERIEURES: 1^{er} N°2^e N°

N°

3^e N°

DATE DE DÉPÔT:

4^e N°SIGNATURE
DU DEMANDEUR
OU
DE SON
MANDATAIRE

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT
DE LA DEMANDE À L'IN.P.I.

11) PUBLICATION 2 528 853

12) ENREGISTREMENT NATIONAL

82 10891

NATURE DU DOCUMENT

A1 DEMANDE

CE BREVET D'INVENTION

22 JUIN

1982

51 OU 23/12/83

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

DÉPÔT POSTAL - 99

RATTACHEMENT DE LA DEMANDE DIVISIONNAIRE OU DE LA TRANSFORMATION
NATURE, N° ET DATE DE LA DEMANDE INITIALE:

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

CABINET PLASSFRAUD:
84, rue d'Amsterdam,
75009 - PARIS -

☒ BRI (22) DATE DE DÉPÔT
☐ CEI (31) BOPI DEMANDE N°
☐ TR (47) BOPI DELIVRANCE N°

DATE DE DELIVRANCE

CLASSIFICATION INTERNATIONALE

OU

CLASST 3

C07H 17/04 ;

DATE
REMI
DES I

N° D'
NATI

CERTIFICAT D'UTILITÉ

1) TITRE DE L'INVENTION (54)

"Nouveaux trisaccharides à structure D-glucosamine,
acide L-iduronique, D-glucosamine et leur préparation"

2) DEMANDEUR: NOM ET PRÉNOMS OU DÉNOMINATION ET FORME JURIDIQUE: (71)

N° SIRENE, LE CAS ÉCHÉANT

1

CHOAY s.a.

4) ADRESSE COMPLETE:

48, avenue Théophile Gautier,
75782 - PARIS CEDEX 16 -

PAYS

FRANCE

5) INVENTEUR (72)

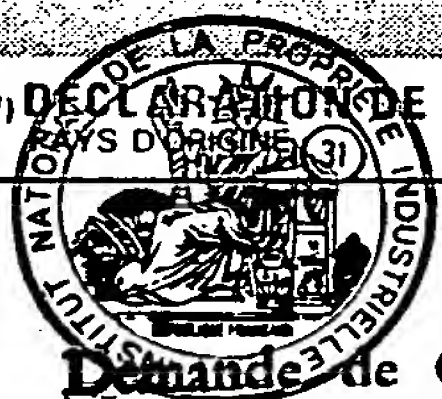
LE DEMANDEUR EST
L'INVENTEUR :

NON

7) DECLARATION DE PRIORITE (30)

DATE DE DÉPÔT (32)

NUMÉRO (33)



Demande de Certificat d'Utilité résultant de la transformation
de la Demande de Brevet déposée le 22.06.82
(Article 20 de la loi du 2 Janvier 1968 modifiée et articles 42 et 43
du Décret du 19 Septembre 1979)

P. de G. (Req)
P. de G. (Pub)
Des et Rev

Avis Doc

Pl. de Des

D. Invent

Abrégé

TOTAL

8) RATTACHEMENT DU CERTIFICAT D'ADDITION:

NATURE DE LA DEMANDE PRINCIPALE:

ADDITIONS ANTERIEURES: 1° N°

2° N°

N°
3° N°

4° N°

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)
ChP.MTB-100-82-01

N° d'enregistrement national

82.10891

Titre de l'invention :

"Nouveaux trisaccharides à structure D-glucosamine,
acide L-iduronique, D-glucosamine et leur préparation"

Le(s) soussigné(s)

CHOAY s.a. 48, avenue Théophile Gautier,
75782 - PARIS CEDEX 16 -

représentée par son mandataire :

CABINET PLASSERAUD,
84, rue d'Amsterdam, - 75009 - PARIS -

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (nom, prénoms, adresse)

Jean CHOAY,
21, rue Saint-Guillaume,
75007 - PARIS -

Jean-Claude JACQUINET,
1, allée André Gide,
45100 ORLEANS-LA-SOURCE

Maurice PETITOU,
27, rue du Javelot - Appart. 201 -
75645 PARIS CEDEX 13 -

Pierre SINAY
5, rue Jacques Monod,
45100 - ORLEANS -




Date et 22.06.1982
signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

CABINET PLASSERAUD
Par Procuration

[Signature]

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

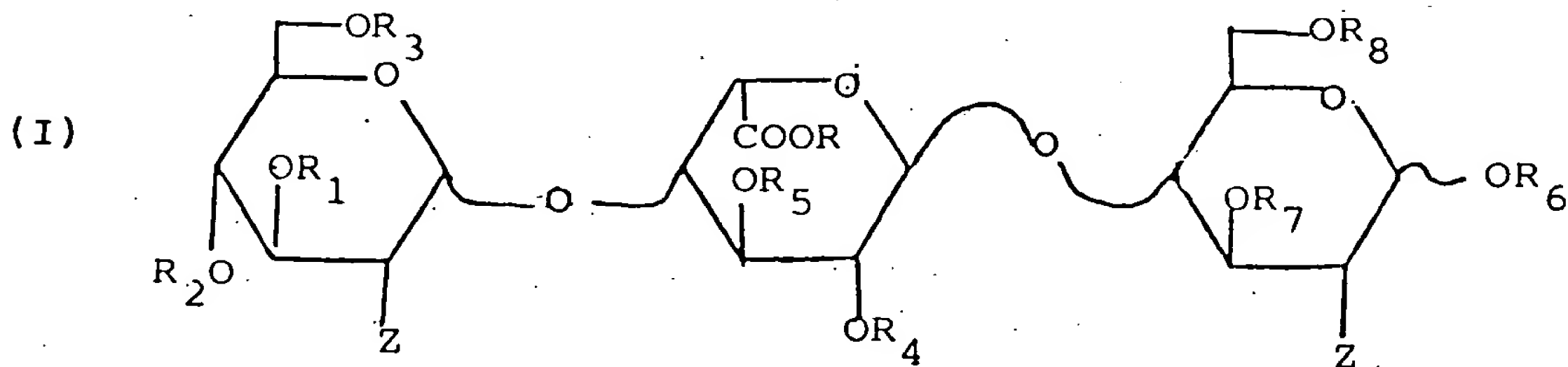
PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
				30.9.82	6. 10.82 AB

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

"Nouveaux trisaccharides à structure D-glucosamine, acide L-iduronique, D-glucosamine et leur préparation"

L'invention a pour objet de nouveaux trisaccharides formés d'un enchaînement de motifs respectivement à structure D-glucosamine, acide L-iduronique, D-glucosamine.

Les trisaccharides de l'invention répondent plus spécialement à la formule I :



10 dans laquelle

- R_1 , R_3 , R_4 et R_8 représentent un atome d'hydrogène, un groupe sulfate, ou un groupe protecteur,

- R_2 , R_5 , R_6 et R_7 représentent un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur,

15 - R représente un groupe alcoyle, notamment de 1 à 3 atomes de carbone, en particulier le groupe méthyle, ou un cation métallique tel que le sodium, ou organique tel qu'un dérivé de base organique azotée,

- les radicaux Z, identiques ou différents, représentent un groupe fonctionnel azoté, ou un groupe azide, ou amine ou $-NHSO_3^-$.



Une famille préférée de trisaccharides de l'invention renferme avantageusement au moins un motif, de préférence les deux motifs D-glucosamine, comportant un groupe N-sulfate en position 2.

Dans un groupe préféré de cette famille, R_1 représente un groupe $-SO_3^-$.

Des trisaccharides préférés parmi ceux évoqués ci-dessus sont en outre avantageusement substitués en position 6 par un groupe -O-sulfate, c'est-à-dire qu'au moins l'un des substituants R_3 ou R_8 , avantageusement les deux, 5 représentent un groupe SO_3^- .

Dans une autre famille préférée, les trisaccharides ci-dessus renferment en outre un motif acide L-iduronique comportant un groupe -O-sulfate en position 2.

Les positions restantes de ces trisaccharides 10 sont libres ou protégées par des groupements de blocage dont la nature est choisie selon l'application envisagée pour ces produits.

D'une manière avantageuse, la séquence trisaccharidique de l'invention se retrouve dans des fragments 15 ou des fractions d'héparine ou d'héparan-sulfate possédant notamment une activité spécifique anti-Xa (Yin et Wessler) plus élevée que celle de l'héparine et une activité anti-coagulante globale, mesurée selon le titre USP, plus faible.

20 On rappelle que les titres Yin et Wessler et USP sont définis notamment dans la demande de brevet FR No 78 31857 du 6 novembre 1978 au nom de la Demanderesse.

Les produits de l'invention sont donc particulièrement intéressants en tant qu'intermédiaires de synthèse pour l'obtention de produits doués d'activité 25 dans des tests de coagulation spécifiques de certains facteurs et plus spécialement du facteur Xa.

Ils sont également avantageusement utilisables 30 comme produits de référence pour l'étude de ce type de structure.

On mesure, en outre, l'intérêt de leur obtention par voie de synthèse, selon un processus de mise en oeuvre aisée.

Le procédé de préparation de trisaccharides 35 de l'invention comprend : la condensation de dérivés



réactifs d'un monosaccharide à structure D-glucosamine et d'un disaccharide formé d'un enchainement de motifs à structure α -acide L-iduronique- β -D-glucosamine répondant aux caractéristiques suivantes.

5 Dans ces composés de départ, toutes les positions sont bloquées exceptées celles devant intervenir pour l'établissement de la liaison glycosidique entre le monosaccharide et le disaccharide.

10 Pour l'établissement d'une liaison de type 1,4 α , on a recours à un monosaccharide possédant un groupe réactif en position 1 et à un disaccharide possédant en position 4 un groupe capable de réagir avec le groupe réactif du monosaccharide.

15 Les halogénures du monosaccharide étant aisément accessibles, on base avantageusement la condensation sur une réaction entre un halogénure du monosaccharide et un alcool du disaccharide.

20 Comme déjà souligné, les autres positions de ces composés doivent être bloquées et ce, par des groupements de blocage n'intervenant pas dans la réaction de condensation, compatibles entre eux et éliminables soit à la fois soit par séquence pour introduire des groupements fonctionnels désirés ou libérer certains groupements -OH.

Les positions des motifs de la chaîne trisaccharidique destinées à être occupées par des groupements N-sulfate sont substituées par des groupements azotés précurseurs, inertes vis-à-vis de la réaction de glycosylation et permettant l'introduction des groupements souhaités sur les motifs de la chaîne trisaccharidique en particulier l'introduction de groupes -O-sulfate.

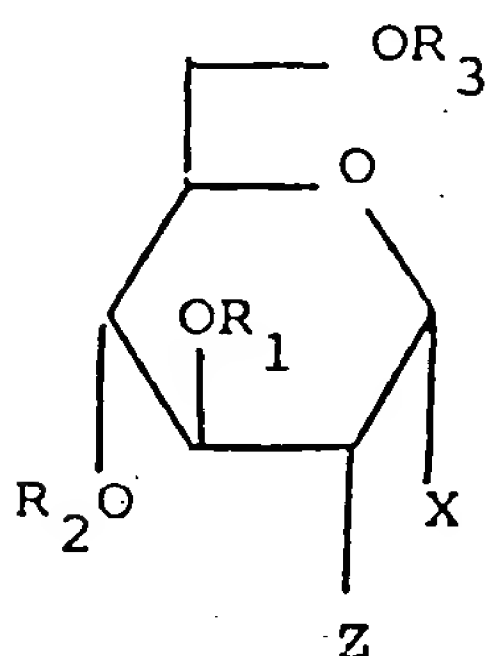
30 Pour permettre l'introduction de ces groupes O-sulfate, selon un mode préféré de réalisation de l'invention, on utilise, comme groupes de blocage dans les produits de départ, des groupes -O-CO-CH₃. A partir de ces



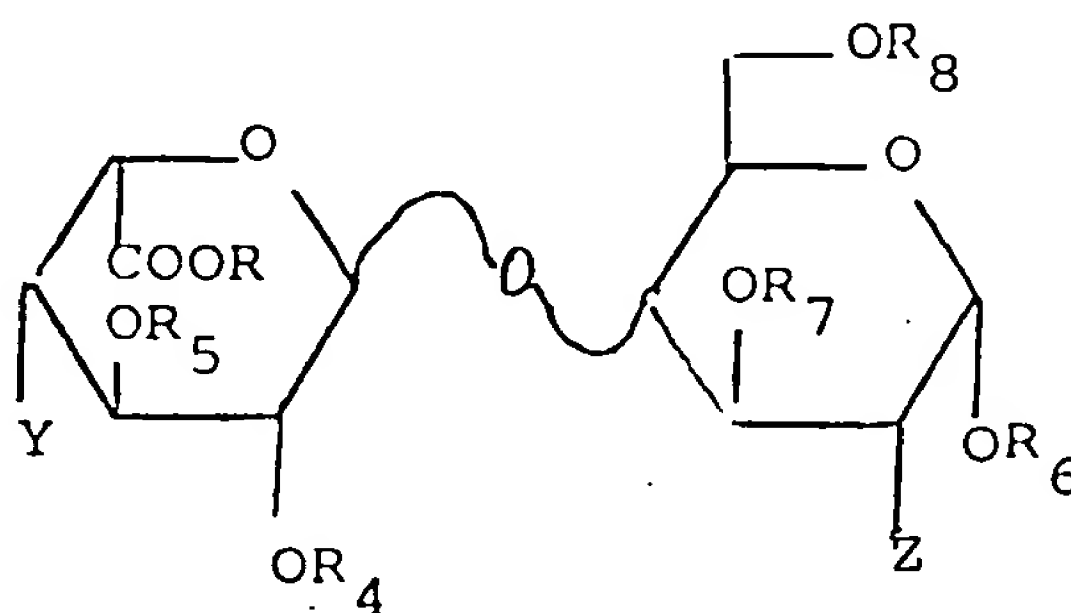
groupes $-O-CO-CH_3$, on peut libérer les radicaux hydroxyle, puis les soumettre à une réaction de sulfatation, tandis que les positions destinées à être occupées par des groupes $-OH$, sont avantageusement substituées par des radicaux inertes durant la réaction de sulfatation, tels que les radicaux benzyle.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, on fait réagir, dans une première étape un monosaccharide et un disaccharide répondant respectivement aux formules I et II

(II)



(III)



dans lesquelles :

- X et Y représentent deux groupements réactifs capables de donner lieu à l'établissement d'une liaison glycosidique, en particulier, X représente un halogène, plus spécialement du brome et Y un groupe $-OH$;
- R_1 à R_8 représentent desgroupements de blocage des radicaux $-OH$ et plus spécialement R_1, R_3, R_4 et R_8 représentent des groupes $-COCH_3$ et R_2, R_5, R_6 et R_7 représentent des groupes benzyle ;
- Z représente des groupements fonctionnels azotés capables de conduire au groupe N-sulfate désiré tout en permettant la réalisation du processus de synthèse de l'invention, et en particulier, un groupe azide pour le monosaccharide et un groupe $-NHA$ pour le disaccharide, dans lequel A représente un groupe benzyloxycarbonyle et
- R représente un groupe de blocage du radical carboxyle, notamment un groupe alcoyle, tel que le radical méthyle.



Le disaccharide de formule III est avantageusement obtenu selon le procédé de la demande de brevet FR 82 01575 du 1.02.1982 au nom de la Demanderesse.

Après avoir constitué la chaîne trisaccharidique selon l'enchaînement souhaité, on procède au cours d'une deuxième étape, à l'introduction des groupes -O-sulfate par acétolyse des groupes O-acétyl, notamment à l'aide de soude, puis à une réaction de sulfatation, par exemple, à l'aide d'un complexe du type triméthylamine/ SO_3 .

Au cours d'une étape supplémentaire, on procède ensuite à l'élimination des différents groupements benzyle afin de libérer les radicaux -OH qui les protègent, avantageusement par hydrogénation à l'aide d'hydrogène en présence de catalyseur, puis on soumet les groupes amine des motifs glucosamine à une réaction de sulfatation, pour obtenir les dérivés $-\text{NHSO}_3^-$ correspondants.

Les produits intermédiaires mis en oeuvre dans ce procédé sont nouveaux et, en tant que tels, entrent dans le cadre de l'invention.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent.

Les formules des composés dont question dans ces exemples sont représentées sur la figure unique. Les numéros indiqués correspondent à ceux utilisés dans les exemples pour désigner les mêmes composés. Les symboles utilisés dans la figure ont les significations suivantes : Ac : acétyl, Bn : benzyle, S : SO_3^- , Me : méthyle, A : benzyloxycarbonate, TMA : triméthylamine.

EXEMPLE 1 - Synthèse du trisaccharide 3 -

Une solution du bromure 1 (préparé selon H. PAULSEN et W. STENZEL, Chem. Ber 111 (1978) 2334-2347, 110 mg, 0,25 mM) et de l'alcool 2 (préparé selon la demande de brevet FR, No 82.01575 au nom de la Demanderesse, 113 mg, 0,13 mM) dans du dichlorométhane anhydre (2,5 ml) est agitée à l'abri de la lumière sous atmosphère d'argon



sec en présence de tamis moléculaire 4 Å (poudre, 100 mg) pendant 30 mn. Après refroidissement à 20°C, de la symcol-
lidine (70 µl, 0,55 mM) et du triflate d'argent (78 mg, 0,30 mM) sont ajoutés successivement et l'agitation est

5 maintenue dans ces conditions pendant 2 heures. Le mélange réactionnel est alors dilué avec du dichlorométhane (50 ml), les solides sont essorés, et le filtrat est lavé avec une solution 0,1 M d'acide chlorhydrique glacée, avec de l'eau, avec une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, avec de l'eau, séché (sulfate de sodium),
10 filtré et évaporé.

Le résidu est chromatographié sur une colonne de gel de silice (18 g). L'élution par le mélange hexane :
acétate d'éthyle (4:3, v/v) donne le trisaccharide 3 sous
15 forme d'un verre incolore qu'il n'a pas été possible de cristalliser (139 mg, 88%) ; $[\alpha]_D^{20} = + 83^\circ$ (cl, chloroforme) ;
Spectre RMN (90 MHz, CDCl₃) : δ : 7,25 (m, 25H, 5Ph.) ;
5,44 (d. de d., 1H, H₃", J_{2"}, 3" : 10,5 Hz, J_{3"}, 4" : 9 Hz) ;
5,26 (d, 1H, H₁", J_{1"}, 2" : 3,5 Hz) ; 3,59 (s, 3H, COOMe) ;
20 3,06 (d. de d., 1H, H", J_{1"}, 2" : 3,5 Hz, J_{2"}, 3" : 10,5 Hz) ;
2,12, 2,08, 2,01 et 1,97 (4s, 12H, 4 OAc).

EXEMPLE 2 - Synthèse du trisaccharide 4 -

Une solution de trisaccharide 3 (122 mg) dans un mélange de 1,2-diméthoxyéthane (6ml) et de méthanol (2ml) est agitée à 0°C. Une solution aqueuse 1 M de soude (2ml) est ajoutée goutte à goutte en 10 mn, et le mélange réactionnel est agité 6 heures à 0°C. De l'acide chlorhydrique 1 M est alors ajouté goutte à goutte jusqu'à pH = 0 (apparition d'un précipité blanc). Le mélange est versé dans de l'eau glacée (100 ml) et extrait avec du chloroforme (5 fois
30 10 ml). Les phases organiques sont lavées avec de l'eau glacée, séchées (sulfate desodium), filtrées et évaporées. Le résidu sirupeux est dissous dans du méthanol (2 ml) et traité par une solution étherée de diazométhane jusqu'à
35 persistance de la coloration jaune. Après 30 mn., le mélange réactionnel est évaporé à sec. Le résidu est chromato-



phié sur une colonne de gel de silice (10 g). L'élution par le mélange acétate d'éthyle/hexane (2:1,v/v) donne le trisaccharide 4 sous forme d'une mousse incolore qu'il n'a pas été possible de cristalliser (85 mg, 81%) ; $[\alpha]_D^{20} = + 77^\circ$ (cl, chloroforme), spectre RMN (90 MHz, CDCl_3) : absence de signaux OAc^- (vers $\delta = 2$ ppm). Analyse élémentaire : en accord avec la structure recherchée.

EXEMPLE 3 - Synthèse du trisaccharide 5 -

A une solution du dérivé 4 (41 mg) dans le DMF (2 ml) on ajoute du complexe triméthylamine/trioxyde de soufre (TMA/SO_3 ; 60 mg ; 2,5 équivalents par OH). Après une nuit à 50°C , la réaction est complète. Du méthanol (0,5ml) est ajouté puis la solution est déposée sur une colonne de Séphadex LH-20 (1,5 x 25 cm) équilibrée dans un mélange chloroforme/méthanol (1:1 ; v/v). L'élution par le même mélange permet de séparer le produit de la réaction de l'excès de réactif et du solvant de réaction. Le résidu obtenu est chromatographié sur une colonne de gel de silice (10 g), élué par un mélange acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (98 : 56 : 13 : 32 ; v/v/v/v). Le produit pur obtenu est dissous dans du méthanol, puis passé à travers une colonne de résine Dowex 50W x 4, Na^+ (5ml). Après évaporation et séchage, on obtient le dérivé 5 (58 mg, 100%). Il est homogène en c.c.m. (acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau ; 5 : 5 : 1 : 3 ; v/v/v/v et acétate d'éthyle/méthanol/acide acétique ; 7 : 3 : 0,1 : v/v/v). $[\alpha]_D^{20} = + 55^\circ$ (méthanol). Le spectre de RMN est compatible avec la structure recherchée.

EXEMPLE 4 - Synthèse du trisaccharide 6 -

Une solution du composé 5 (20 mg) dans un mélange de méthanol (2ml) et d'eau (0,5ml) est agitée pendant 96 heures sous une pression d'hydrogène de 0,2 bar, en présence de Pd/C à 5% (20 mg). Le catalyseur est alors éliminé par filtra-



tion. L'analyse en ultra-violet confirme l'absence de noyaux aromatiques. Après évaporation, le produit est engagé dans la synthèse du trisaccharide 7.

EXEMPLE 5 : Synthèse du trisaccharide 7 -

5 Le dérivé 6 obtenu précédemment est dissous dans l'eau (2 ml). Le pH de la solution est ajusté à 9,5 puis il est maintenu à cette valeur au moyen d'un pH-stat. On ajoute alors le complexe TMA/SO₃ (14 mg ; 5 éq./NH₂). Après une nuit, la même quantité de complexé
10 est ajoutée. Après 48 heures, le pH est amené à 12 au moyen de soude 2M, puis il est maintenu à cette valeur pendant 2 heures. Après neutralisation par l'acide chlorhydrique, le mélange réactionnel est chromatographié sur une colonne de Séphadex G-25, éluée avec de l'eau. Le composé
15 7 est détecté par une réaction colorée au carbazole, caractéristique des acides uroniques (Bitter et Muir, Anal. Biochem. 4 (1962) 330-334). Ces fractions contenant 7 sont regroupées et passées au travers d'une colonne de résine Dowex 50W x 4, Na⁺ éluée avec de l'eau. Après lyophilisation, on
20 obtient 7 (4,5 mg).

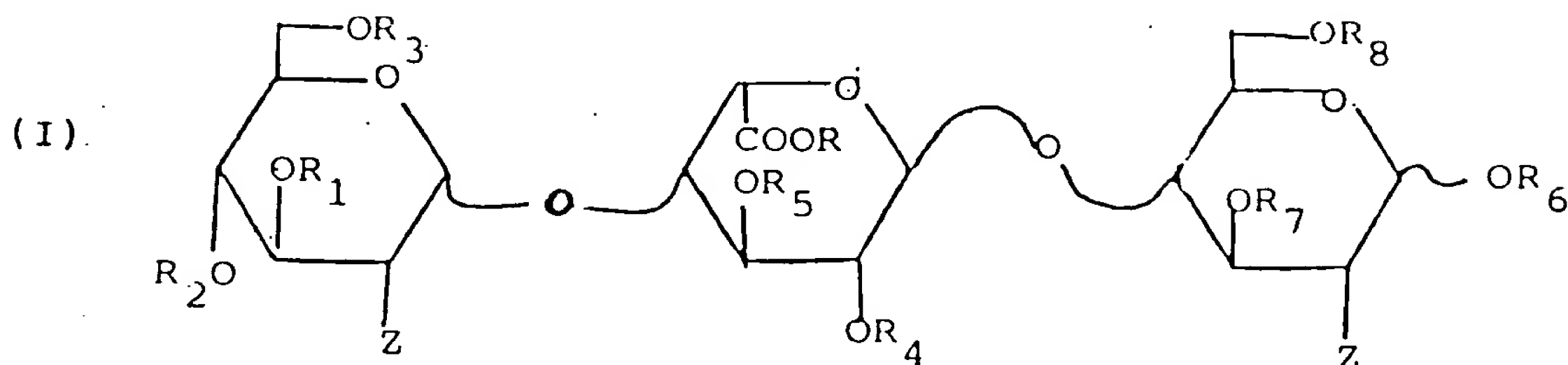
L'analyse colorimétrique des constituants glucidiques donne 2,55 moles d'acide uronique pour 5,15 moles de glucosamine (rapport 1/2).

Le spectre de RMN de ce produit confirme la structure (séquence, anomérie des liaisons, substitutions par les sulfates).



REVENDICATION

Trisaccharides caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule :



5

dans laquelle

- R_1 , R_3 , R_4 et R_8 représentent un atome d'hydrogène, un groupe sulfate, ou un groupe protecteur,

- R_2 , R_5 , R_6 et R_7 représentent un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur,

10

- R représente un groupe alcoyle, notamment de 1 à 3 atomes de carbone, en particulier le groupe méthyle, ou un cation métallique tel que le sodium, ou organique tel qu'un dérivé de base organique azoté

- les radicaux Z, identiques ou différents, représentent un groupe fonctionnel azoté, ou un groupe azide, ou amine ou $-NH_3^+$.



FIGURE

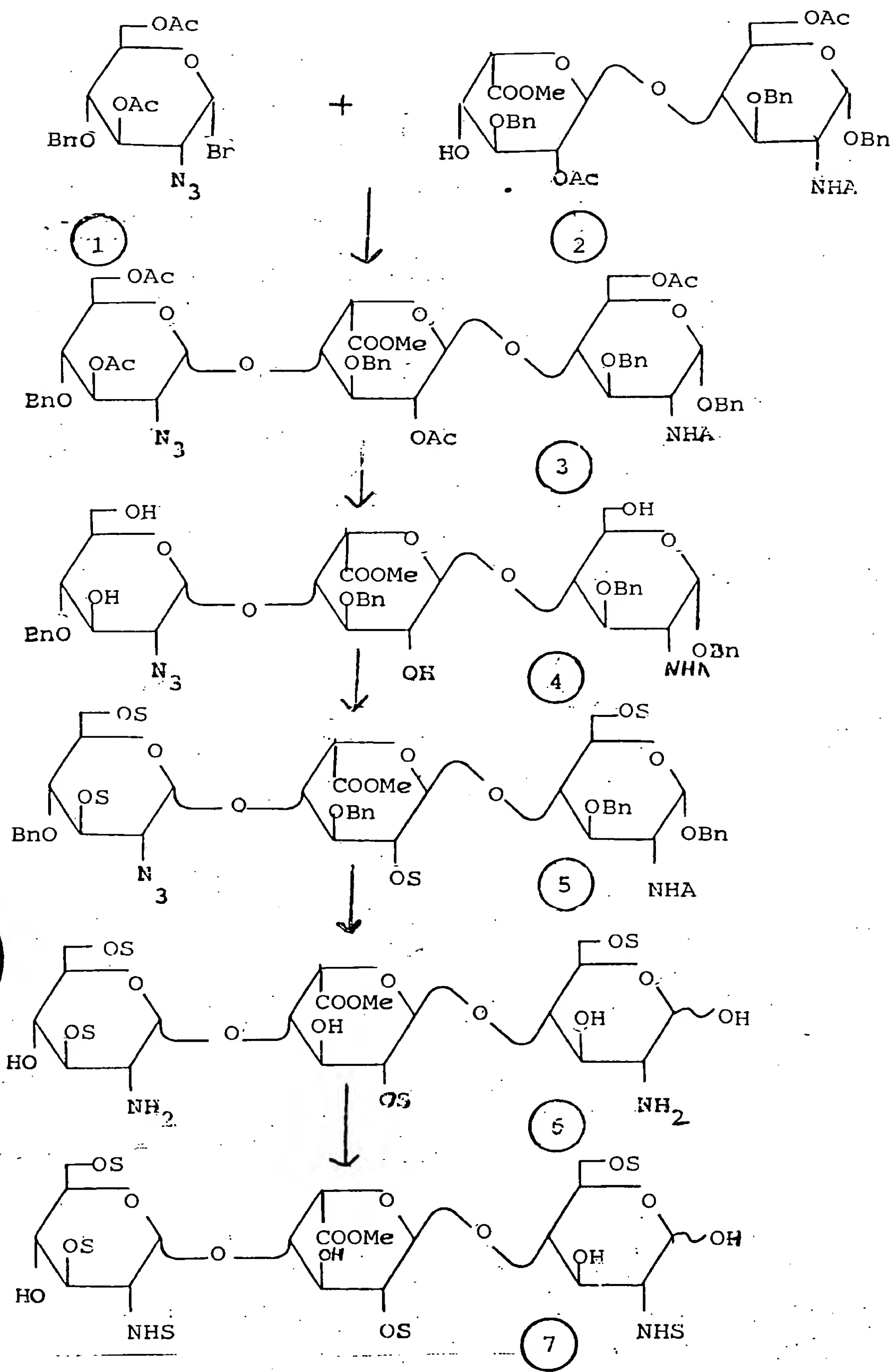


PLANCHE UNIQUE

